因子信号通路抑制奶牛乳腺上皮细胞凋亡的体外研究

赵艳坤　邵　伟　雒诚龙　武开乐　余　雄*

(新疆农业大学动物科学学院，新疆肉乳用草食动物营养实验室，乌鲁木齐 830052)

摘　要：本试验旨在探究 Janus 激酶/信号转导及转录活化因子（JAK/STAT）信号通路是否参与脐带间充质干细胞（UC-MSCs）通过类胰岛素样生长因子-Ⅰ(IGF-Ⅰ)抑制奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)凋亡的调节。将 UC-MSCs 和 BMECs 利用 Transwell™ 小室双层共培养，以 BMECs 单纯培养为对照，给予类胰岛素样生长因子-Ⅰ受体（IGF-ⅠR）抑制剂 AG1024 进行干预，并用信号阻断剂 AG490 处理细胞，24 h 后采用实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病-2（*Bcl*-2）、B 细胞淋巴瘤/白血病基因伴随蛋白 x（*Bax*）、半胱氨酸蛋白酶 3(*Caspase*-3)基因的相对表达丰度，流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果表明：UC-MSCs 和 BMECs 共培养组 BMECs 的凋亡率极显著低于其他各组（$P<0.01$）；UC-MSCs 和 BMECs 共培养组 *Bcl*-2 基因的相对表达丰度较 BMECs 组极显著上调（$P<0.01$），*Caspase*-3、*Bax* 基因的相对表达丰度则显著或极显著下调（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；AG1024 和 AG490 单独处理或二者共同处理升高了单独培养的 BMECs 和与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 的凋亡率，并上调了 *Bax*、*Caspase*-3 基因的相对表达丰度，下调了 *Bcl*-2 基因的相对表达丰度，均具有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。由此得出，UC-MSCs 能够通过 IGF-Ⅰ介导 JAK/STAT 信号通路调节 BMECs 凋亡相关基因的表达，降低 BMECs 的凋亡率。

关键词：脐带间充质干细胞；乳腺上皮细胞；共培养；IGF-Ⅰ；JAK/STAT；凋亡

收稿日期：2016-09-28
基金项目：奶产业体系资助（CARS-37）；2015 年国家自然科学基金资助（31560645）；新疆农业大学畜牧学博士后工作站资助；新疆维吾尔自治区高等学校科研计划项目资助（XJEDU2013S17）；2013 年度新疆研究生科研创新项目（xjau-2013-yjsky-XJGRI2013113）；新疆肉乳用草食动物营养实验室开放课题资助
作者简介：赵艳坤（1990-），女，河南周口人，博士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail：452349621@qq.com
*通信作者：余　雄，教授，博士生导师，E-mail：yuxiong8763601@126.com

中图分类号：S852.2　　　　　　文献标识码：A　　　　　　文章编号：

脐带间充质干细胞（umbilical cord mesenchymal stem cells,UC-MSCs）是间充质干细胞（mesenchymal stem cells,MSCs）家族的重要成员，不仅保持了 MSCs 多向分化潜能，还具有强大的自分泌/旁分泌功能，可分泌血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEFG）、类胰岛素样生长因子-Ⅰ(insulin like growth factor-Ⅰ,IGF-Ⅰ)、表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)等多种细胞因子[1]，其中 IGF-Ⅰ对乳腺发育和泌乳功能调控具有重要作用，在阻止乳腺上皮细胞凋亡中发挥关键作用[2]。目前，公认的 IGF-Ⅰ发挥抗凋亡作用主要通过磷脂酰肌醇-3 激酶（phosphatidylinositol-3-kinase,PI3K）[3]和丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号通路来实现[4]，且作用机制已清晰。研究发现，体外培养的奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary gland epithelial cells,BMECs)中，PI3K 调节亚基可诱导转录因子——信号转导及转录活化因子（signal transducer and activator of transcription，STAT）调节细胞凋亡[5]；此外，类胰岛素样生长因子-Ⅰ受体(insulin like growth factor-Ⅰ receptor,IGF-IR)可以激活 PI3K、MAPK、Janus 激酶(Janus kinase,JAK)等多种胞内亚单位[6]，产生级联信号转导反应，通过启动相关的信号通路来抑制细胞凋亡，这 3 条信号途径对细胞的存活都是必需的，当其中有信号通路被阻断后，IGF-Ⅰ就不能对抗多种因素引起的细胞凋亡反应。因此，随着对 BMECs 凋亡调控途径的不断探索，近些年，在乳腺方面，主要研究热点集中在 JAK/STAT 信号通路，其在参与调节乳腺组织增殖、代谢、凋亡、泌乳等生物学功能中发挥重要作用[7]，但非外源性 IGF-Ⅰ介导的 JAK/STAT 信号通路在 BMECs 抗凋亡中并未见报道。本团队前期工作已成功构建 UC-MSCs 和 BMECs 无血清最佳共培养体系，且发现共培养减弱了共培养体系细胞的凋亡[8]，但具体作用机制并不清楚，因此本研究从模拟体内内源性细胞因子调节细胞凋亡的角度出发，将 UC-MSCs 和 BMECs 利用 Transwell™ 小室共培养，采用 IGF-ⅠR 抑制剂和 JAK/STAT 信号阻断剂，探究 JAK/STAT 是否参与 UC-MSCs 通过 IGF-Ⅰ抑制 BMECs 凋亡及相关基因表达的调节作用，以揭示与

UC-MSCs 共培养对 BMECs 凋亡的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验设计与分组

在前期试验[8]的基础上，按照 UC-MSCs 和 BMECs 最佳共培养条件，应用 Transwell™ 小室（孔径 0.4 μm）建立上下双层细胞共培养体系，在上室接种 BMECs 1 mL（1×10^5/孔），下室接种 UC-MSCs 2 mL（1×10^5/孔），并以单纯培养 BMECs 作为对照。48 h 之后给予 IGF-ⅠR 抑制剂 AG1024（10 μmol/L）和/或 JAK 抑制剂 AG490（50 μmol/L）处理细胞，均置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱常规培养，培养液为无血清基础培养基（serum free medium,SFM），培养 24 h 后吸取上清并采用胰酶消化法收集细胞，-20 ℃保存备用。按照试验设计，试验共设 8 组，分别为 BMECs（单纯培养 BMECs）、BMECs/UC-MSCs（共同培养 BMECs 和 UC-MSCs）、BMECs+AG1024（AG1024 处理单纯培养的 BMECs）、BMECs/UCMSCs+AG1024（AG1024 处理与 UC-MSCs 共培养的 BMECs）、BMECs+AG490（AG490 处理单纯培养的 BMECs）、BMECs/UC-MSCs+AG490（AG490 处理与 UC-MSCs 共培养的 BMECs）、BMECs+AG490+AG1024（AG1024 与 AG490 共同处理单纯培养的 BMECs）、BMECs/UCMSCs+AG490+AG1024 组（AG1024 与 AG490 共同处理与 UC-MSCs 共培养的 BMECs），每组均设 3 个平行。

1.2 试验材料

1.2.1 试验细胞来源

UC-MSCs：前期试验[8]体外分离培养并鉴定的荷斯坦奶牛UC-MSCs；BMECs：购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2.2 主要仪器和试剂

倒置显微镜（Motic-AE31）、CO_2培养箱（HF151UV）、Transwell™小室（Corning）、AG1024(Alexis)、AG490（Sigma）、实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR,RT-qPCR)

试剂盒(上海诺伦生物医药技术有限公司），膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)/碘化丙啶(propidium iodide，PI)检测试剂盒(上海博古生物科技有限公司）、流式细胞仪（Becton Dickinson Facscalibour）。

1.3 指标测定与方法

应用流式细胞仪联合 Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒采用检测各组细胞凋亡情况；参考 RT-qPCR 试剂盒检测各组细胞半胱氨酸蛋白酶 3(cysteine aspartic acid specific protease，*Caspase*-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2，*Bcl*-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病基因伴随蛋白 x(Bcl-associated x protein,*Bax*)基因的表达丰度，以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参基因，基因序列均从 GenBank 中获取，引物用 Primer 5.0 软件进行设计，由上海博古生物科技有限公司合成，见表 1；采用 Annexin V-FITC/PI 双染法进行细胞凋亡检测，方法参照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书，应用流式细胞仪测定。

细胞凋亡率（%）=[(凋亡细胞+继发死亡细胞)/全部细胞数]×100。

表 1　引物序列

Table 1　Sequences of primers

基因 Genes	引物序列 Primer sequences （5′-3′）	产物大小 Product size/bp
β-肌动蛋白 β-actin	F:CTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGC R:CCAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	101
B 细胞淋巴瘤/白血病-2 *Bcl*-2	F:AGGGACGGGGTGAACTGG R:CTACCCAGCCTCCGTTATCC	175
B 细胞淋巴瘤/白血病基因伴随蛋白 x *Bax*	F:GGATGCGTCCACCAAGAAG R:TGAAGTTGCCGTCAGAAAACA	161
半胱氨酸蛋白酶 3 *Caspase*-3	F:AGAACTGGACTGTGGCATTGAG R:GCACAAAGCGACTGGATGAAC	160

1.4　数据统计与分析

数据采用 SPSS 18.0 软件进行方差分析，结果用平均值±标准差(mean±SD)表示，以 $P<0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2　结　果

2.1　AG1024 干预下 AG490 对细胞凋亡率的影响

各组细胞凋亡散点如图 1 所示，横坐标是 Annexin V-FITC，纵坐标是 PI，Q1 区域代表机器损伤细胞，Q2 区域代表晚期凋亡细胞或继发性坏死亡细胞，Q3 区域代表正常细胞，Q4 区域代表早期凋亡细胞。

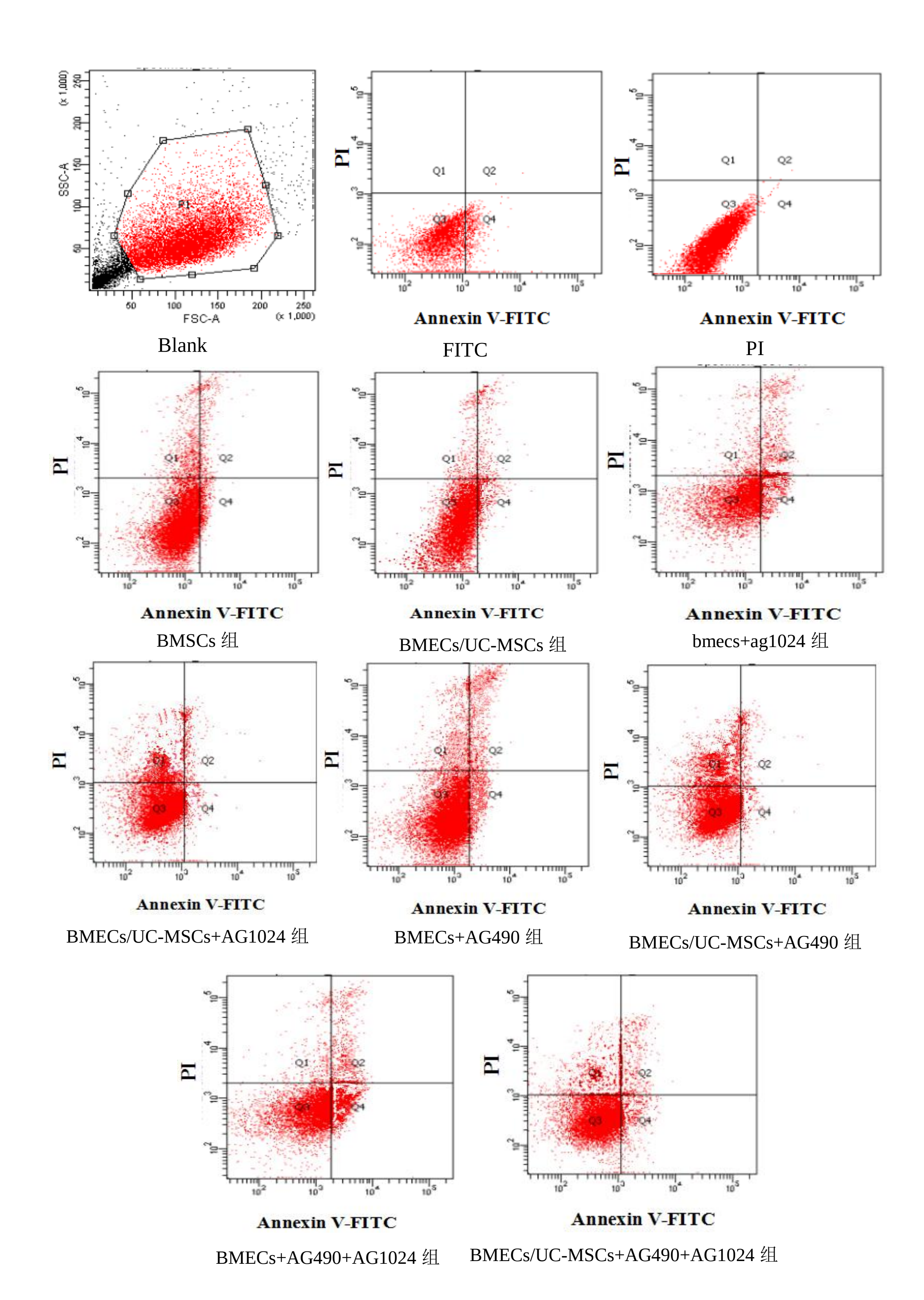


图 1　各组细胞凋亡散点图

Fig.1　Apoptosis scatter plot diagram of each group

各组细胞凋亡率结果如图 2 所示，BMECs/UC-MSCs 组的细胞凋亡率极显著低于其他各组（*P*<0.01）；AG1024 处理极显著升高了单独培养的 BMECs 以及与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 的凋亡率（*P*<0.01）；AG490 处理显著升高了单独培养的 BMECs 的凋亡率（*P*<0.05），极显著升高了与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 的凋亡率（*P*<0.01）；AG490 与 AG1024 共同处理极显著升高了单独培养的 BMECs 以及与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 的凋亡率（*P*<0.01）。

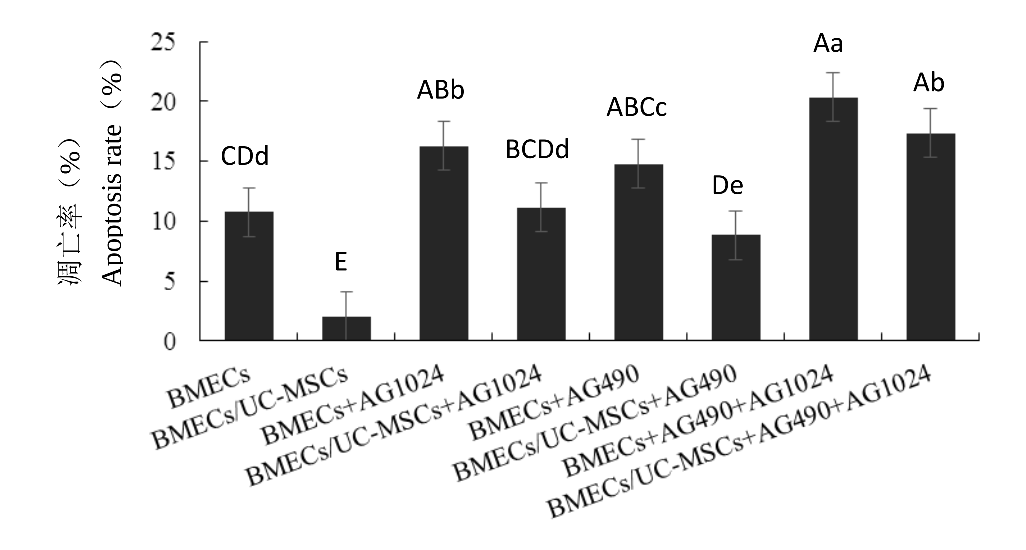


图 2　各组细胞凋亡率

Fig.2　Apoptosis rate of cells in each group

数据柱标有不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），不同大写字母表示差异极显著（*P*<0.01）。

Data columns with different small letters mean significant difference (*P*<0.05), and with different capital letters mean significant difference (*P*<0.01).

2.2　AG1024干预下AG490对细胞凋亡相关基因表达的影响

RT-qPCR 结果如表 2 所示，BMECs/UC-MSCs 组的 *Caspase*-3、*Bax* 基因的相对表达丰度显著或极显著低于其他各组（*P*<0.05 或 *P*<0.01），*Bcl*-2 基因的相对表达丰度则极显著高于其他各组（*P*<0.01）；AG1024 或 AG490 处理单独培养的 BMECs 和与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 后 *Caspase*-3、*Bax* 基因的相对表达丰度均显著或极显著上调（*P*<0.05），AG1024 与

AG490 共同处理单独培养的 BMECs 和与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 后 *Caspase*-3、*Bax* 基因的相对表达丰度均极显著上调（P<0.01）；除 AG1024 处理单独培养的 BMECs 后 *Bax* 基因的相对表达丰度稍有下调（P>0.05）外，AG1024 处理与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 或 AG49 处理单独培养的 BMECs 和与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 后 *Bax* 基因的相对表达丰度均显著或极显著下调（P<0.05 或 P<0.01），AG1024 与 AG490 共同处理单独培养的 BMECs 和与共 UC-MSCs 培养的 BMECs 后 *Bax* 基因的相对表达丰度均显著或极显著下调（P<0.05 或 P<0.01）。

表 2　AG1024 干预下 AG490 对细胞凋亡相关基因表达的影响

Table 2　Effects of AG490 on the expression of apoptosis related genes under AG1024 intervention

组别 Groups	相对表达丰度 Relative expression abundance		
	半胱氨酸蛋白酶 3 *Caspase*-3	B 细胞淋巴瘤/白血病-2 *Bcl*-2	B 细胞淋巴瘤/白血病基因伴随蛋白 x *Bax*
BMECs	0.201±0.016^{BCDd}	0.328±0.104^{Bb}	0.308±0.012^{BCe}
BMECs/UC-MSCs	0.146±0.008^{Df}	0.558±0.162^{A}	0.213±0.011^{Cf}
BMECs+AG1024	0.232±0.019^{ABCc}	0.301±0.019^{Bbc}	0.409±0.021^{ABb}
BMECs/UC-MSCs+AG1024	0.182±0.007^{CDe}	0.364±0.187^{Ba}	0.312±0.015^{BCde}
BMECs+AG490	0.274±0.017^{ABb}	0.284±0.096^{Bc}	0.398±0.007^{ABb}
BMECs/UC-MSCs+AG490	0.226±0.114^{ABCc}	0.316±0.063^{Bb}	0.337±0.012^{ABCcde}
BMECs+AG490+AG1024	0.306±0.051^{Aa}	0.251±0.004^{Bd}	0.485±0.106^{Aa}
BMECs/UC-MSCs+AG490+AG1024	0.286±0.102^{ABab}	0.288±0.002^{Bc}	0.378±0.014^{ABb}

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），不同大写字母表示差异极显著（P<0.01）。

In The same column, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), and with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01).

3 讨 论

3.1 IGF-Ⅰ参与 UC-MSCs 抑制 BMECs 凋亡的调节

细胞凋亡是基因控制的细胞的自然死亡，*Bcl*-2 家族中的 *Bcl*-2、*Bax* 基因是目前已知的细胞凋亡中功能相互对立的一对最重要的调控基因[9]，而 *Caspase*-3 是细胞凋亡的主要执行者[10]。本试验结果显示，与单纯培养 BMECs 相比，共培养 BMECs 和 UC-MSCs 使细胞的凋亡率极显著降低，*Caspase*-3、*Bax* 基因的相对表达丰度显著或极显著下调，*Bcl*-2 基因的相对表达丰度极显著上调。这说明与 UC-MSCs 共培养可以明显下调 BMECs 促凋亡基因的表达，上调抗细胞凋亡基因的表达，从而抑制 BMECs 的凋亡，这与图 2 细胞凋亡率数据相吻合。前期试验已证实无血清培养条件下，UC-MSCs 和 BMECs 共培养可以显著提高 IGF-Ⅰ及 IGF-ⅠR 含量，且 IGF-Ⅰ主要存在于 UC-MSCs 中，而 IGF-Ⅰ需要与 IGF-ⅠR 结合来激活下游信号通路，实现其生物学功能[8]。本试验中，AG1024 处理 24 h 之后，显著上调了 BMECs 中 *Caspase*-3、*Bax* 基因的表达，下调了 *Bcl*-2 基因的表达，极显著提高了 BMECs 的凋亡率，而与 UC-MSCs 共培养后下调了促凋亡基因的表达，凋亡率也显著降低。多项研究已证明 UC-MSCs 可以分泌包括 IGF-Ⅰ在内的多种促细胞生长因子[11-12]；研究发现 IGF-Ⅰ在调控 BMECs 凋亡中具有重要作用[13-14]；另有报道称 IGF-Ⅰ在小鼠泌乳下降阶段减缓了 BMECs 的凋亡[15]；高玉红等[16]也通过试验证明 IGF-Ⅰ对 BMECs 凋亡有明显抑制作用。本试验结果与前人研究结果一致，但不同之处在于本试验采用的是无血清培养基，排除了外源因子的干扰，Transwell™ 小室又能准确反映出 UC-MSCs 对 BMECs 的影响，由此表明 UC-MSCs 是通过 IGF-Ⅰ实现对 BMECs 凋亡的抑制的。

Wareski 等[17]发现凋亡相关因子如凋亡启动子 *Bax*、凋亡抑制子 *Bcl*-2 和凋亡操纵子

Caspase-3 在整个泌乳期都表达，*Bax* 和 *Caspase*-3 表达的上调伴随着 BMECs 死亡的持续性增加以及干乳期凋亡细胞数目的增多。因此可以说 UC-MSCs 可以通过自身分泌的 IGF-Ⅰ流通至上室影响 BMECs，IGF-Ⅰ对 BMECs 发挥内源性保护机制以下调促凋亡基因 *Bax* 和 *Caspase*-3 的表达，上调抗凋亡因子 *Bcl*-2 的表达，削减促凋亡因子对 BMECs 的损害，联合抗凋亡因子维持或促进 BMECs 的生长，最终达到抑制 BMECs 凋亡的作用，由于 BMECs 自身不能持续分泌 IGF-Ⅰ等生长因子，所以体外将 UC-MSCs 和 BMECs 共培养可代替外源性添加 IGF-Ⅰ来抑制 BMECs 的凋亡，这为延长 BMECs 生长、增殖分化过程等提供了一个新颖的方法。

3.2 UC-MSCs 通过 IGF-I抑制 BMECs 凋亡的可能途径

凋亡的发生及发展的开关就是信号传递，诱导细胞凋亡的因素主要是通过受体介导进入细胞内，经信号传递进入中央调控阶段，激活相应凋亡相关因子，最后使细胞结构改变引起死亡[18]。那么 IGF-Ⅰ对 BMECs 发挥抗凋亡的具体分子机制又是怎样的呢？前人已报道 IGF-Ⅰ可激活 PI3K/AKT、MAPK 等信号通路对其他类型的细胞促增殖、抗凋亡等作用[19]，而 JAK/STAT 信号途径参与细胞增殖、分化、功能发挥、凋亡等过程，是一条重要的介导细胞因子信号传导的通路[20]，那 UC-MSCs 内源性分泌的 IGF-Ⅰ是否可以激活 JAK/STAT 这条重要的信号通路对 BMECs 发挥抗凋亡的作用呢？迄今并未见报道。因此本试验在前期试验的基础上进行更深一步的探索。

本试验结果显示，AG490 处理的 BMECs 的凋亡率较正常培养的 BMECs 显著升高，且 AG490 处理的与 UC-MSCs 共培养的 BMECs 的凋亡率极显著升高。研究称 AG490 作为 JAK 激酶抑制剂，可以有效阻断 JAK2 和 JAK3 的激活，从而阻断 JAK/STAT 信号通路传导[21]。这说明本试验中 JAK/STAT 信号通路参与了 BMECs 凋亡变化过程。但 BMECs 与 UC-MSCs 共培养时加入 AG490 后则极显著降低了 BMECs 的凋亡率，这说明 UC-MSCs 可以有效再次激活被阻断的 JAK/STAT 信号通路，降低 BMECs 的凋亡率。而图 2 中，与无处理的 BMECs

相比，AG490 和 AG1024 共同处理的 BMECs 的凋亡率极显著升高，AG490 和 AG1024 单独处理的 BMECs 的凋亡率也均显著升高，再与 UC-MSCs 共培养则 BMECs 的凋亡率更是极显著升高，表明被抑制的 IGF-Ⅰ切断了 JAK/STAT 信号通路，促进了 BMECs 凋亡，这揭示了 IGF-Ⅰ介导 JAK/STAT 信号通路参与对 BMECs 凋亡的调节。表 2 结果与凋亡率结果一致，当 IGF-Ⅰ和 JAK/STAT 被阻断， *Caspase*-3、*Bax* 基因的表达下调的同时，相应的 *Bcl*-2 基因的表达上调，*Bcl*-2 与 *Bax* 比值下降，诱导了 BMECs 的凋亡。研究发现，IGF-Ⅰ的缺失会引发 BMECs 凋亡，STAT3 的磷酸化伴随着乳腺的复原性退化[22]；有报道称，乳腺退化时 BMECs 内的 *Bax*、*Caspase*-3 基因表达丰度的上升[23]；Xiong 等[24]发现，AG490 可阻断 JAK/STAT3 信号通路，下调 *Bcl*-2 基因的表达；另有报道瘦素、催乳素等可能通过激活 JAK/STAT5 信号通路参与对乳腺生长发育的调控[25-26]，JAK/STAT5 信号通路被阻断则会诱导 BMECs 的凋亡，影响泌乳功能[27]。这提示 UC-MSCs 可能是通过独立的分泌功能分泌的 IGF-Ⅰ与其受体 IGF-ⅠR 结合，吸引 JAK 聚集磷酸化，JAK 又磷酸化活化 STAT，激活 JAK/STAT 信号通路，上调抗凋亡基因、下调促凋亡基因的表达，进而发挥对 BMECs 凋亡的抑制作用，但对于 IGF-Ⅰ是否和其他激素或生长因子共同作用亦或是有其他通路的参与以及通路的协同作用等尚不明确。

4 结 论

在体外无血清共培养条件下，IGF-ⅠR 抑制剂和 JAK/STAT 信号阻断剂单独处理均可促进 BMECs 的凋亡，但同时处理较单独处理的 BMECs 的凋亡率显著升高，而 UC-MSCs 能够通过 IGF-Ⅰ介导 JAK/STAT 信号通路调节 BMECs 凋亡相关基因的表达，降低 BMECs 的凋亡率。

参考文献：

[1] GUILLOT P V,GOTHERSTROM C,CHAN J,et al.Human first-trimester fetal MSC express

pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC[J].Stem Cells,2007,25(3):646–654.

[2] 牛朝诗.IGF-ⅠR 与细胞增殖、凋亡和肿瘤[J].国外医学·生理、病理科学与临床分册,2000,20(3):212–215.

[3] 黄露麒,王万铭.IGF-Ⅰ通过 PI3K/Akt 通路抑制 MPP+诱导 PC12 细胞凋亡机制的研究[J].中风与神经疾病杂志,2014,31(10):897–899.

[4] FLEMING J M,BRANDIMARTO J A,COHICK W S.The mitogen-activated protein kinase pathway tonically inhibits both basal and IGF-Ⅰ-stimulated IGF-binding protein-5 production in mammary epithelial cells[J].Journal of Endocrinology,2007,194(2):349–359.

[5] GUO C,YANG L,WAN C X,et al.Anti-neuroinflammatory effect of Sophoraflavanone G from *Sophora alopecuroides* in LPS-activated BV2 microglia by MAPK,JAK/STAT and Nrf2/HO-1 signaling pathways[J].Phytomedicine,2016,23(13):1629–1637.

[6] 王俊宏.胰岛素样生长因子Ⅰ受体与细胞凋亡信号转导[J].国外医学 生理、病理科学与临床分册,2002,22(5):445–447.

[7] HACHIM I Y,SHAMS A,LEBRUN J J,et al.A favorable role of prolactin in human breast cancer reveals novel pathway-based gene signatures indicative of tumor differentiation and favorable patient outcome[J].Human Pathology,2016,53:142–152.

[8] 王立文.奶牛乳腺上皮细胞和奶牛脐带间充质干细胞共培养的试验研究[D].硕士学位论文.乌鲁木齐:新疆农业大学,2014:35–38.

[9] 董雅洁,高维娟.*Bcl*-2、*Bax*、C*aspase*-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J].中国老年学杂志,2012,32(21):4828–4830.

[10] 袁长青,丁振华.Caspase 的结构与功能[J].国外医学分子生物学分册,2002,24(3):146–151.

[11] CHEN K,WANG D,DU W T,et al.Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism[J].Clinical Immunology,2010,135(3):448–458.

[12] DENG Y,ZHANG Y,YE L,et al.Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct monocytes towards an IL10-producing phenotype by secreting IL6 and HGF[J].Science Reports,2016,5(6):37566.

[13] HA W T,JEONG H Y,LEE S Y,et al.Effects of the insulin-like growth factor pathway on the regulation of mammary gland development[J].Development & Reproduction, 2016,20(3):179–185.

[14] TONNER E,ALLAN G,SHKRETA L,et al.Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland[J].Advances in Experimental Medicine and Biology,2000,480:45–53.

[15] HADSELL D L,BONNETTE S G,LEE A V.Genetic manipulation of the IGF-Ⅰ axis to regulate mammary gland development and function[J].Journal of Dairy Science,2002,85(2):365–377.

[16] 高玉红,李庆章.IGFs 对小鼠乳腺 *IGFBP*-5 和 *Cyclin D*1 表达的影响[J].中国乳品工业,2007,35(11):41–43.

[17] WARESKI P,MOTYL T,RYNIEWICZ Z,et al.Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat[J].Small Ruminant Research,2001,40(3):279–289.

[18] 黄鑫华.泌乳期牛乳腺上皮细胞凋亡的研究[D].硕士学位论文.大庆:黑龙江八一农垦大学,2007.

[19] GAO H N,HU H,ZHENG N,et al.Leucine and histidine independently regulate milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells via mTOR signaling pathway[J].Journal of Zhejiang University Science B,2015,16(6):560–572.

[20] ZHANG X K,DARNELL J E.Functional importance of STAT3 tetramerization in activation of the α2-macroglobulin gene[J].Journal of Biological Chemistry,2001,276(36):33576–33581.

[21] HEBENSTREIT D,HOREJS-HOECK J,DUSCHL A.JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines[J].Drug News & Perspectives,2005,18(4):243–249.

[22] 黄田英,李庆章,侯晓明.乳腺中 JAK-STAT 信号通路的研究进展[J].中国乳品工业,2010,38(2):41–44.

[23] 肖阳,张莉,高学军,等.奶牛乳腺上皮细胞凋亡周期性规律及机理研究[J].畜牧与兽医,2012,44(Suppl.1):229–230.

[24] XIONG H,ZHANG Z G,TIAN X Q,et al.Inhibition of JAK1,2/STAT3 signaling induces apoptosis,cell cycle arrest,and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells[J].Neoplasia,2008,10(3):287–297.

[25] 田青,季昀,庞学燕,等.胰岛素对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成调节机理的研究[J].动物营养学报,2013,25(3):550–560.

[26] 邢媛媛,李大彪,李红磊,等.催乳素对奶牛乳腺上皮细胞乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响[J].动物营养学报,2016,28(8):2439–2447.

[27] KE Y H,LESPERANCE J,ZHANG E E,et al.Conditional deletion of Shp2 in the mammary gland leads to impaired lobulo-alveolar outgrowth and attenuated Stat5 activation[J].Journal of Biological Chemistry,2006,281(45):34374–34380.

An *in Vitro* Study of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Inhibite Bovine Mammary Gland Epithelial Cells Apoptosis by Insulin Like Growth Factor-Ⅰ Mediated Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway

ZHAO Yankun SHAO Wei LUO Chenglong WU Kaile YU Xiong*

(*Xinjiang Meat Emulsions with Plant-Eating Animal Nutrition Laboratory, College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi* 830052, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to explore whether Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway was involved in regulation of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) by insulin like growth factor-Ⅰ (IGF-Ⅰ) inhibited bovine mammary gland epithelial cells (BMECs) apoptosis. UC-MSCs and BMECs were co-cultured by Transwell™ double chamber, BMECs cultured alone as control, cells was treated with insulin like growth factor-Ⅰ receptor (IGF-ⅠR) inhibitor AG1024 and signal blocking agent AG490. After 24 h, the relative expression abundances of B-cell lymphoma/leukemia-2 (*Bcl*-2), Bcl-associated x protein (*Bax*), cysteine aspartic acid specific protease (*Caspase*-3) were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and flow cytometry was adopted to detect apoptosis changes of cells. The results showed as follows: the apoptosis rate of BMECs in UC-MSCs and BMECs co-culture group was significantly lower than in other groups (P<0.01); the relative expression abundance of *Bcl*-2 gene in UC-MSCs and BMECs co-culture group was significantly increased than the BMECs group (P<0.01), while the relative expression abundances of *Caspase*-3 and *Bax* genes were significantly decreased (P<0.05 or P<0.01). Treated by AG1024 or/and AG490, the apoptosis rate of single cultured BMSCs and co-cultured BMSCs with UC-MSCs was raised, and the relative expression abundances of *Bax* and *Caspase*-3 genes were

up-regulated, while the relative expression abundance of *Bcl*-2 gene was down-regulated, and they were statistically significant (P<0.05 or P<0.01). In conclusion, UC-MSCs can regulate the expression of apoptosis relation genes in BMECs by IGF-Ⅰ mediated JAK/STAT signaling pathway, and reduce the apoptosis rate of BMECs.

Key words: umbilical cord mesenchymal stem cells; mammary epithelial cells; co-culture; IGF-Ⅰ; JAK/STAT; apoptosis

脚注在此处，word 加不上，排版时处理一下，谢谢：

*Corresponding author, professor, ，E-mail： yuxiong8763601@126.com (责任编辑 菅景颖)